UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Maestría Ciencias Del Ambiente
Generación 2016-2018

TRABAJO DE INTERVENCIÓN:

Caracterización y remediación de dos sitios contaminados por hidrocarburos en las localidades: Temapache y Tierra Blanca Boxter, Veracruz.

PRESENTA:

ING. GISELLE MEDINA NUÑEZ

DIRECTOR:
MBT. OSWALDO JAVIER ENCISO DIAZ

CODIRECTOR:
DRA. IVETTE ALICIA CHAMORRO FLORESCANO

TUXPAN, VERACRUZ ENERO, 2019

ÍNDICE

I.INTRODUCCIÓN 1

II.ANTECEDENTES 3

2.1.Suelo 3

2.2.Contaminación por hidrocarburos en suelo 3

2.3.Normatividad 4

2.4.Tecnologías aplicadas a la remediación 5

2.5.Tratamientos de remediación biológicos 6

2.5.1.Tratamientos *in situ* 6

2.5.2.Tratamientos *ex situ.* 7

2.6.Trabajos de remediación con reactores slurry 7

2.7.Microorganismos utilizados en biorremediación 8

2.7.1.Bacterias 8

2.7.2.Hongos 9

III.OBJETIVOS 11

3.1.Objetivo general 11

3.2.Objetivos particulares 11

IV.ÁREA DE ESTUDIO 12

4.1.Localización del área de estudio 12

4.2.Delimitación de la zona contaminada 13

V.MATERIAL Y MÉTODOS 15

5.1.Toma de muestras y análisis de suelo 15

5.2. Análisis fisicoquímicos del suelo 15

5.2.1.Determinación de la concentración HTP en el suelo 15

5.3. Análisis preliminar de la actividad microbiana en las muestras de suelo .. 17

5.4.Identificación microbiana y selección de microrganismos hidrocarbonoclastas 17

5.5. Cultivo de microrganismos para la biorremediación del suelo 19

5.6. Degradación de HTP bajo condiciones experimentales 19

VI.RESULTADOS 21

6.1.Propiedades físicas de Temapache y Tierra Blanca Boxter, Ver. 21

6.2.Propiedades químicas de Tierra Blanca Boxter y Temapache, Ver. 22

6.3.Extracción de HTP de Tierra Blanca Boxter y Temapache, Ver. 23

6.4.Análisis preliminar de la actividad microbiana en las muestras de suelo ... 23

6.5.Identificación y selección microbiana: Bacterias y hongos 23

6.6.Valoración de la eficiencia de los tratamientos biológicos de descontaminación de Tierra Blanca Boxter y Temapache, Ver. 24

VII.DISCUSIÓN 27

VIII.CONCLUSIONES, APLICACIÓN PRÁCTICA DEL TRABAJO Y RECOMENDACIONES 31

8.1.Conclusiones 31

8.2.Aplicación práctica del trabajo 31

8.3.Recomendaciones 32

IX.BIBLIOGRAFIA 35

X.ANEXOS 41

Anexo 1. Método 3540 C establecido por la EPA utilizando hexano como disolvente 41

Anexo 2. Resultados obtenidos durante la extracción de HTP con Hexano 42

Anexo 3. Aislamiento microbiano de Tierra Blanca Boxter y Temapache, Ver 43

Anexo 4. Tinción Gram y azul de algodón 48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del Municipio de Álamo Temapache 12
Figura 2. Polígono de un sitio contaminado por derrames de hidrocarburos y de un sitio conservado de la localidad de Tierra Blanca Boxter, Ver. 13
Figura 3. Polígono de un sitio contaminado por derrames de hidrocarburos y de un sitio conservado de la localidad de Temapache, Ver. 14
Figura 4. Aislamiento microbiano mediante disoluciones seriadas. 18
Figura 5. RSA simulado. 20
Figura 6. Concentración inicial y final HTP por RSA de Tierra Blanca Boxter. 25
Figura 7. Concentración inicial y final HTP por RSA de Temapache. 26

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Bacterias comunes que participan en la degradación de hidrocarburos. 9
Cuadro 2. Hongos comunes que participan en la degradación de hidrocarburos. 10
Cuadro 3. Composición química para 1L de medio mineral. 18
Cuadro 4. Composición de los tratamientos biológicos. 19
Cuadro 5. Propiedades físicas de Tierra Blanca Boxter y Temapache, Ver. ... 21
Cuadro 6. Propiedades químicas de Tierra Blanca Boxter y Temapache, Ver. 22
Cuadro 7. Concentración inicial y final (Promedio ± desviación estándar) de los resultados obtenidos de degradación en Tierra Blanca Boxter. 25
Cuadro 8. Concentración inicial y final (Promedio ± desviación estándar) de los resultados de degradación obtenidos en Temapache. 26
Cuadro 9. Resultados de HTP con Hexano 42
Cuadro 10. Bacterias aisladas de Tierra Blanca Boxter 43
Cuadro 11. Hongos aislados en Tierra Blanca Boxter 45
Cuadro 12. Bacterias aisladas en Temapache 46
Cuadro 13. Hongos aislados en Temapache 48

DEDICATORIAS

Mi trabajo de intervención va dedicado a:

A mí misma:

Giselle Medina Nuñez por no desistir y luchar a pesar de las dificultades que se presentaron en los dos años de maestría.

A mi familia:

Mis padres Ignacio Medina Reyes y Areli Nuñez Cerecedo

Mis hermanas Tania Medina Nuñez y Jennifer Medina Nuñez

Mis hermosos sobrinos Barbara Salas Medina, Daniel Ignacio Vera Medina y Lia Sofia Vera Medina.

"El fracaso es solo la oportunidad de comenzar de nuevo de forma más inteligente".

-Henry Ford

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por brindarme la beca de manutención durante tres semestres y durante mi movilidad nacional con número de registro 782285.

A mi familia, por apoyarme el primer semestre de la maestría que estuve sin beca y por estar conmigo siempre incluso en la distancia cuando me fui de movilidad a Cuernavaca, Morelos.

A mi director, el Mbt. Oswaldo Javier Enciso Díaz por aceptar dirigir mi trabajo de intervención cuando se lo propuse y por estar siempre al pendiente, por su valioso tiempo ya que a pesar de tener otras actividades estaba disponible para mí cuando la comisión revisora me hacía observaciones y las atendía conmigo. A la Dra. Ivette Alicia Chamorro Florescano por orientarme como tutora y brindarme su ayuda como codirectora, gracias por sus aportaciones las cuales fueron buenas para mi proyecto.

A mi comisión revisora, la Dra. María Rebeca Rojas Ronquillo, el Dr. Rodrigo Cuervo González y el Dr. Eduardo A. Zarza Meza por sus comentarios y aportaciones en cada evento académico ya que me ayudaron a mejorar mi trabajo de intervención.

A la Dra. Roció Rodríguez Cabrera por su amistad y apoyo en el laboratorio de suelos de la Universidad Veracruzana durante mis análisis físicos y químicos del suelo.

A la Dra. Diana Laura Diaz Inocencio que me brindó su apoyo en el laboratorio de bromatología de la Universidad Veracruzana durante la extracción de hidrocarburos de los suelos contaminados que analice.

Al Dr. Juan Manuel Pech Canche por ayudarme a interpretar los datos obtenidos de mi proyecto.

A la Dra. María Del Refugio Trejo por aceptarme en el laboratorio de biotecnología ambiental del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) y ser mi tutora en mi movilidad nacional.

Al Dr. Daniel Morales Guzmán por ser mi guía en el laboratorio de biotecnología ambiental del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) quien me enseño técnicas nuevas y me ayudo a desarrollar el proceso de biorremediación.

A la Biol. Sharon Azareel Cervantes Angulo y a la Biol. Vicky Estefany Reyes Solís por la amistad que me brindaron en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Veracruzana.

A la Biol. Karla Karina Andrade Hernández y a la Biol. Dulce Maripaz Hernández Mendoza por la amistad que me brindaron en los dos años de la maestría, la cual quiero seguir conservando.

A dios y a mi niña por guiarme e iluminar mi camino.

RESUMEN

Las bacterias y los hongos desempeñan una función importante en suelos contaminados debido a que ciertos géneros y especies tienen la capacidad de degradar o transformar los contaminantes a sustancias menos tóxicas. En el presente trabajo, se evaluó el proceso de biorremediación en reactores slurry a suelos contaminados por hidrocarburos provenientes de dos localidades ubicadas al Norte de Veracruz: Tierra Blanca Boxter y Temapache. Se recolectaron muestras de los suelos contaminados mediante un muestreo dirigido para el análisis de las propiedades fisicoquímicas y el aislamiento e identificación de bacterias y hongos nativos de los suelos. Una vez realizado el aislamiento microbiano, se seleccionaron los microorganismos con capacidad degradativa, dicha capacidad se comprobó con medio solido Bushnell Haas donde el petróleo es la fuente de carbono y energía. Se realizó el proceso de biorremediación aplicando la técnica de biorreactores y bioaumentación. El proceso constó de tres tratamientos, el primero bioaumentación con bacterias, el segundo bioaumentación con hongos y el tercero bioaumentación con bacterias y hongos. El experimento tuvo una duración de 30 días y resulto más efectivo el tratamiento con hongos y bacterias para ambos sitios, el porcentaje de remoción de HTP fue de 25.31% (TBB) y 68.43% (T). Por lo anterior, el proceso de biorremediación con la técnica empleada se consideró efectivo.

Palabras clave: Bacterias, hongos, contaminación, hidrocarburos, bioaumentación, biorreactores, degradación.

DR. JOSÉ LUIS ALANÍS MÉNDEZ.
COORDINADOR DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS POZA RICA - TUXPAN.
UNIVERSIDAD VERACRUZANA.

PRESENTE:

Por el siguiente medio nos dirigimos a usted de la manera más atenta para infórmale que el trabajo titulado **"Caracterización y remediación de dos sitios contaminados por hidrocarburos en las localidades: Temapache y Tierra Blanca Boxter, Veracruz"** de la **C. Giselle Medina Núñez** ha sido revisado y aprobado como requisito para obtener el grado de: **MAESTRA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE.**

Sin más por el momento, nos despedimos enviando un cordial saludo.

Mbt. Oswaldo Javier Enciso Díaz
Director

Dra. Ivette Alicia Chamorro Florescano
Codirector

Tuxpan de Rodríguez cano Ver., a 18 de enero de 2019.

Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

Revisión del Trabajo de Intervención de la alumna: **Ing. Amb. Giselle Medina Nuñez**

JURADO EXAMINADOR

NOMBRE	FECHA	DICTAMEN	FIRMA
María Rebeca Rojas Renguillo	21/Ene/2019	APROBADO	
Eduardo A. Zarza Meza	21/01/2019	Aprobado	
Rodrigo Cuevas González	21/01/2019	Aprobado	

En la presente revisión se acordó que el Trabajo de Intervención denominado "**Caracterización y remediación de dos sitios contaminados por hidrocarburos en las localidades: Temapache y Tierra Blanca Boxter, Veracruz**" que presenta la sustentante para obtener el Grado de Maestra, está terminado por lo que puede proceder a su inmediata impresión.

I. INTRODUCCIÓN

El suelo es un recurso natural, compuesto por sólidos líquidos y gases, que se caracteriza por tener capas diferentes (Volke *et al.,* 2005; FAO, 2017). Este recurso natural desempeña funciones medioambientales, sociales y económicas, dentro de las cuales pueden mencionarse: producción, ambiente biótico, regulación climática e hidrológica, almacenamiento de nutrientes y materias primas, control de residuos y contaminación, entre otras (Silva y Correa, 2009).

En México, existe actualmente una gran cantidad de sitios contaminados por sustancias orgánicas e inorgánicas, debido principalmente a las actividades industriales (Volke y Velasco, 2002). El estado de Veracruz es uno de los lugares más contaminados a nivel nacional (INE, 2007).

La industria petroquímica ha ocasionado uno de los problemas más serios en materia de contaminación de suelos (Martínez-Prado *et al.,* 2011). Los derrames de hidrocarburos son comunes durante los procesos de producción, comercialización, almacenamiento y distribución (Serrano *et al.,* 2013).

No obstante, actualmente existen diferentes tecnologías para recuperar el suelo contaminado. Dentro de los tratamientos biológicos está la biorremediación, este proceso consiste en utilizar organismos naturales o genéticamente modificados con la capacidad de degradar compuestos orgánicos (Torres, 2003). El objetivo de las técnicas de remediación es transformar contaminantes nocivos a menos tóxicos (Chan *et al.,* 2015).

Por lo anterior la presente investigación tuvo por objetivo determinar la concentración de hidrocarburos en dos localidades: Temapache y Tierra Blanca

Boxter bajo la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 y evaluar la degradación de estos a través consorcios bacterianos y fúngicos utilizando un reactor de suelos activados.

II. ANTECEDENTES

2.1. Suelo

El suelo es un componente natural de carácter multifuncional, que se destaca por proveer una amplia variedad de funciones tales como servir de alimento para las plantas, almacenar nutrientes y poseer materia orgánica proveniente de restos animales y vegetales, entre otros (Silva y Correa, 2009; FAO, 2017; SEMARNAT, 2013).

2.2. Contaminación por hidrocarburos en suelo

El petróleo es un elemento importante para las actividades humanas como fuente de energía y como materia prima (Raiger y López, 2009). En México la industria petrolera ocupa uno de los principales lugares de importancia por los beneficios económicos que genera; sin embargo, sus actividades son también una fuente notable de contaminación debido a que pueden ocasionar daños significativos al medio ambiente (Mendoza *et al.,* 2010), ya que los hidrocarburos pueden ingresar mediante yacimientos naturales y por derrames accidentales o provocados por el hombre (García-Cruz y Aguirre-Macedo, 2015).

Los hidrocarburos están formados por cadenas compuestas de átomos de carbono e hidrógeno y se clasifican de la siguiente forma:

- **Hidrocarburos biogénicos:** Aquellos que se encuentran de manera natural y son sintetizados por microorganismos (bacterias), plantas y animales terrestres y marinos (INE, 2007; Ortínez *et al*. 2003).

- **Hidrocarburos antrópicos:** Aquellos que se generan durante actividades industriales (INE, 2007; Ortínez *et al*. 2003).

2.3. Normatividad

Debido a la problemática de contaminación de hidrocarburos en suelo surge entre otras, la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación.

La norma citada anteriormente contiene métodos analíticos que se deben utilizar para evaluar las concentraciones de hidrocarburos presentes en los suelos contaminados. Los hidrocarburos que se pueden determinar son: Hidrocarburos de fracción ligera, hidrocarburos de fracción media e hidrocarburos de facción pesada. Así mismo, especifica los lineamientos para el plan de muestreo en la caracterización, los tipos de muestreo que se pueden emplear (muestra duplicada, muestra simple, muestreo dirigido, muestreo estadístico) y las especificaciones ambientales para la remediación en donde indica que en el caso de que la concentración de hidrocarburos en todas las muestras de suelo analizadas durante la caracterización sean iguales o menores a los límites máximos permisibles de contaminación establecidos, no serán necesarios los trabajos de remediación. De lo contrario, si el suelo durante la caracterización presenta concentraciones de hidrocarburos por arriba de los límites máximos permisibles de contaminación establecidos, debe ser remediado.

2.4. Tecnologías aplicadas a la remediación

De acuerdo con Volke y Velasco (2002) e INECC (2007) las tecnologías de remediación pueden clasificarse de diferentes maneras, con base en los siguientes principios:

- Destrucción o modificación de los contaminantes. Estas tecnologías modifican la estructura química del contaminante.
- Extracción o separación. Los contaminantes del sitio afectado son extraídos o separados.
- Aislamiento o inmovilización del contaminante. Se utilizan métodos físicos o químicos para estabilizar el contaminante.

Lugar de realización del proceso de remediación. En general, se distinguen dos tipos de tecnología:

- *In situ.* Aquellas que se realizan en el sitio en donde se encuentra la contaminación.
- *Ex situ.* Aquellas que se realizan fuera del sitio donde se encuentra la contaminación (Laboratorio).

Tipo de tratamiento. Esta clasificación se basa en el principio de la tecnología de remediación y se divide en tres tipos de tratamiento:

- Tratamientos biológicos (biorremediación). Este tipo de tratamientos consiste en la utilización de organismos vivos (plantas, hongos y bacterias) con la capacidad de transformar los contaminantes de un sitio determinado a sustancias menos toxicas.

- Tratamientos fisicoquímicos. Este tipo de tratamientos consiste en determinar las propiedades físicas y químicas del sitio contaminado.

2.5. Tratamientos de remediación biológicos

2.5.1. Tratamientos *in situ*

Existen diferentes tipos de tratamientos biológicos in situ, los cuales se presentan a continuación:

Bioventeo. Consiste en estimular la actividad microbiana por medio de la inyección de aire en el sitio contaminado.

Bioaumentación. Es la adición de microorganismos con la capacidad de degradar un contaminante.

Bioestimulación. Consiste en la adición de oxígeno y nutrientes al suelo contaminado con el fin de estimular la actividad de los microorganismos nativos.

Biolabranza. Se refiere a airear el suelo almacenado en montones y ahí mismo agregar agua y nutrientes.

Atenuación natural. Proceso natural que permite reducir la concentración y toxicidad de los contaminantes.

Fitorremediación. Es un proceso que utiliza plantas para remover contaminantes en suelos, sedimentos y agua.

2.5.2. Tratamientos *ex situ.*

Existen diferentes tipos de tratamientos biológicos in situ, los cuales se presentan a continuación:

Composteo. En este proceso el material contaminado es mezclado residuos tales como paja fresca o seca, aserrín, estiércol y desechos agrícolas.

Biopilas. Consiste en formar pilas con el suelo contaminado y estimular la actividad microbiana, agregando aire, agua y nutrientes.

Biorreactores. Es la combinación de procesos químicos, físicos y biológicos que favorecen la biodegradación de un contaminante.

Trabajos de remediación con reactores slurry

Machin-Ramirez y colaboradores en el 2007, evaluaron la biodegradación de hidrocarburos de un lodo proveniente de Minatitlán, Veracruz, utilizando un consorcio bacteriano el cual estaba conformado por seis especies diferentes de bacterias, estas especies pertenecían a los géneros *Pseudomonas, Bacillus* y *Serratia*. El proceso de biorremediación se llevó a cabo a través de un biorreactor slurry en un periodo de 15 días donde obtuvieron 24% de degradación.

Aburto-Medina y colaboradores en el 2012, realizaron la comparación de bacterias nativas y exógenas durante la remediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante un biorreactor slurry, el experimento estaba compuesto de tres tratamientos: Suelo contaminado con hidrocarburos más agua, suelo contaminado con hidrocarburos más agua y nutrientes y suelo contaminado con hidrocarburos más lodo activado y nutrientes (bioaumentación)

estos tratamientos se realizaron durante 42 días donde la remoción de hidrocarburos vario de 41.3-51.6 %.

Las técnicas biológicas han demostrado ser un método ecológicamente sustentable al reducir la concentración de sustancias derivadas del petróleo en ambientes contaminados mediante la actividad hidrocarburolítica de microorganismos nativos (Brutti *et al*., 2018). Por lo anterior y debido al impacto causado por fugas en pozos petroleros de las localidades de Tierra Blanca Boxter y Temapache, Veracruz se realizó la caracterización de ambos sitios donde se analizaron los parámetros físicos y químicos, el aislamiento de microrganismos nativos con capacidad degradativa y la extracción de los hidrocarburos bajo la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, con el fin de proponer y aplicar la técnica biológica RSA.

2.6. Microorganismos utilizados en biorremediación

2.6.1. Bacterias

Durante el proceso de degradación actúan varias especies de bacterias, cada una de estas posee un metabolismo diferente, lo que beneficia dicho proceso ya que pueden consumir hasta 100 % del petróleo de un sitio contaminado. La diversidad de especies y géneros se debe a que estos microorganismos tienen afinidad por ciertos hidrocarburos además de la influencia de algunos factores (pH, temperatura, salinidad, etc.) los cuales determinan las poblaciones durante la degradación (García-Cruz y Aguirre-Macedo, 2015). De las bacterias más comunes que participan en la degradación de hidrocarburos en suelo, se encuentran referidas en el cuadro 1.

Cuadro 1. Bacterias comunes que participan en la degradación de hidrocarburos.

Microorganismo	% de degradación	Periodo de incubación	Referencia bibliográfica
Pseudomonas, Serratia y Bacillus	24 %	15 días	Machin-Ramirez *et al.*, 2007
Aquabacterium y *Haliscomenobacter*	41.3-51.6 %	42 días	Aburto-Medina *et al.*, 2012
Halomonas sp.	95 %	120 días	Haddad *et al.,* 2015
Ochrobactrum cytis, *Ochrobactrum anthropi* y *Sinorhizobium meliloti*	54-93 %	30 días	Abou-Shanab *et al.*, 2016
Pseudomonas spp. y *Alcanivorax spp.*	95-96.1 %	90 días	Koshlaf *et al.,* 2016
Bacillus	84.15 %	35 días	Patowary *et al.,* 2016
Stenotrophomonas sp. y *Pseudomonas sp*.	99.1 %	7 días	Zhu *et al.,* 2016

2.6.2. Hongos

A pesar de que gran parte de los estudios de biorremediación se centran en las bacterias por su capacidad de metabolizar hidrocarburos y por llevar a cabo modificaciones genéticas que permiten degradar determinados contaminantes, la capacidad de los hongos para transformar una gran variedad de compuestos orgánicos y convertirlos en CO^2 y H_2O ha beneficiado los procesos de descontaminación ya que a diferencia de las bacterias, los hongos a través del micelio colonizan diferentes tipos de sustratos lo que facilita el acceso a contaminantes presentes en el suelo (Martin *et al.,* 2004). De los hongos más comunes que participan en la degradación de hidrocarburos en suelo encuentra el género *Aspergillus* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Hongos comunes que participan en la degradación de hidrocarburos.

Microorganismo	**% de degradación**	**Periodo de incubación**	**Referencia bibliográfica**
Acremonium, Aspergillus, Fusarium, Paecillomyces, Penicilium y Trichoderma	5 %- 23.6 %	60 días	Petit *et al.,* 2013
Aspergillus Niger, Aspergillus Flavus y *Aspergillus Terreus*	85 %	30 días	Medina *et al.,* 2014
Aspergillus niger y *aspergillus flavus*	70-80 %	90 días	Araujo *et al.,* 2016
Penicillium, Fusarium y *Aspergillus*	73.53 %	120 horas	Vázquez Martínez *et al.,* 2017

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Realizar la caracterización y remediación de suelos contaminados por hidrocarburos bajo condiciones experimentales en dos localidades de la zona norte de Veracruz.

3.2. Objetivos particulares

- Determinar las propiedades físicas y químicas del suelo contaminado de Temapache y Tierra Blanca Boxter, Veracruz.
- Evaluar la concentración de los HTP en los suelos contaminados.
- Identificar y seleccionar cepas bacterianas y fúngicas de los sitios contaminados.
- Estimar la degradación de HTP mediante consorcios bacterianos y fúngicos.

IV. ÁREA DE ESTUDIO

4.1. Localización del área de estudio

El área de estudio se encuentra ubicada en dos localidades del municipio de Álamo Temapache: Temapache (T) y Tierra Blanca Boxter (TBB). Ambos sitios presentan contaminación por hidrocarburos la cual se deriva de las fallas en el mantenimiento y operación de pozos petroleros.

El municipio de Álamo Temapache se ubica en la región norte del estado de Veracruz. Presenta una distancia de 380 kilómetros a la capital del estado. Debido a la posición territorial marcada en el mapa general de la República Mexicana, Álamo Temapache se encuentra situado entre los paralelos 20° 55' latitud norte y entre los meridianos 97° 41' longitud oeste. La altitud promedio a la que se sitúa en este municipio es de 40 metros sobre el nivel del mar (Figura 1) (INEGI, 2010).

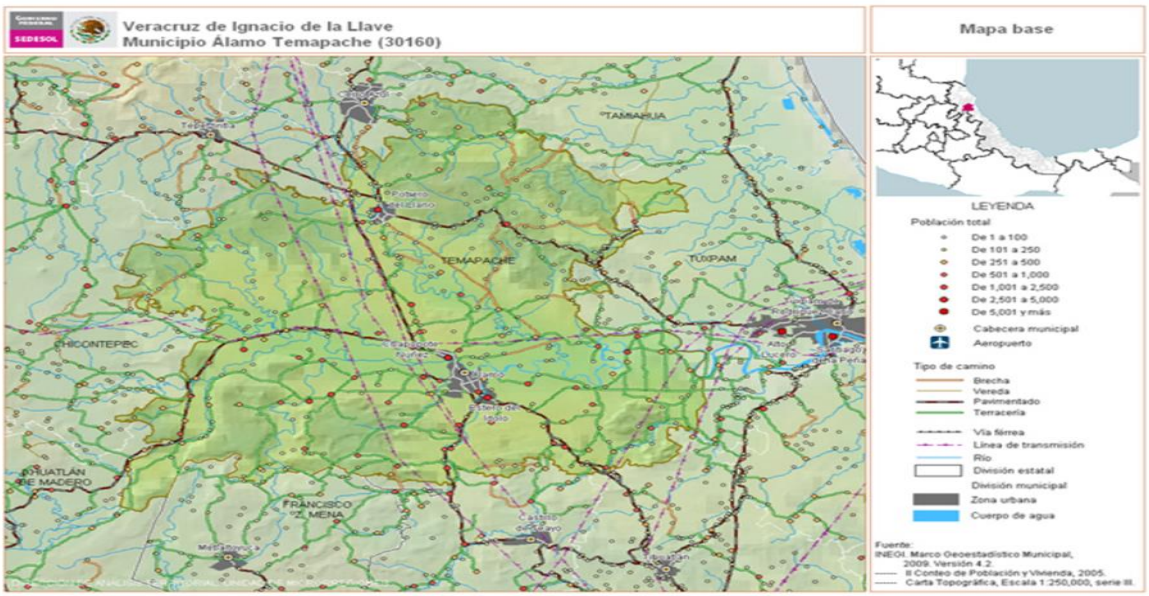


Figura 1. Mapa del Municipio de Álamo Temapache

4.2. Delimitación de la zona contaminada

Se realizó una visita prospectiva en ambos sitios, el área de estudio fue delimitada mediante un GPS y para la elaboración de los polígonos se utilizó el programa Google Earth Pro y ArcGIS 10. La distribución de la mancha de cada sitio se encuentra marcada de color rojo y de color verde el área conservada (Figura 2 y 3). En el terreno de Tierra Blanca Boxter se encontró presencia de cultivos dicha área presento desniveles en la superficie mientras que en Temapache la superficie fue plana y rocosa.

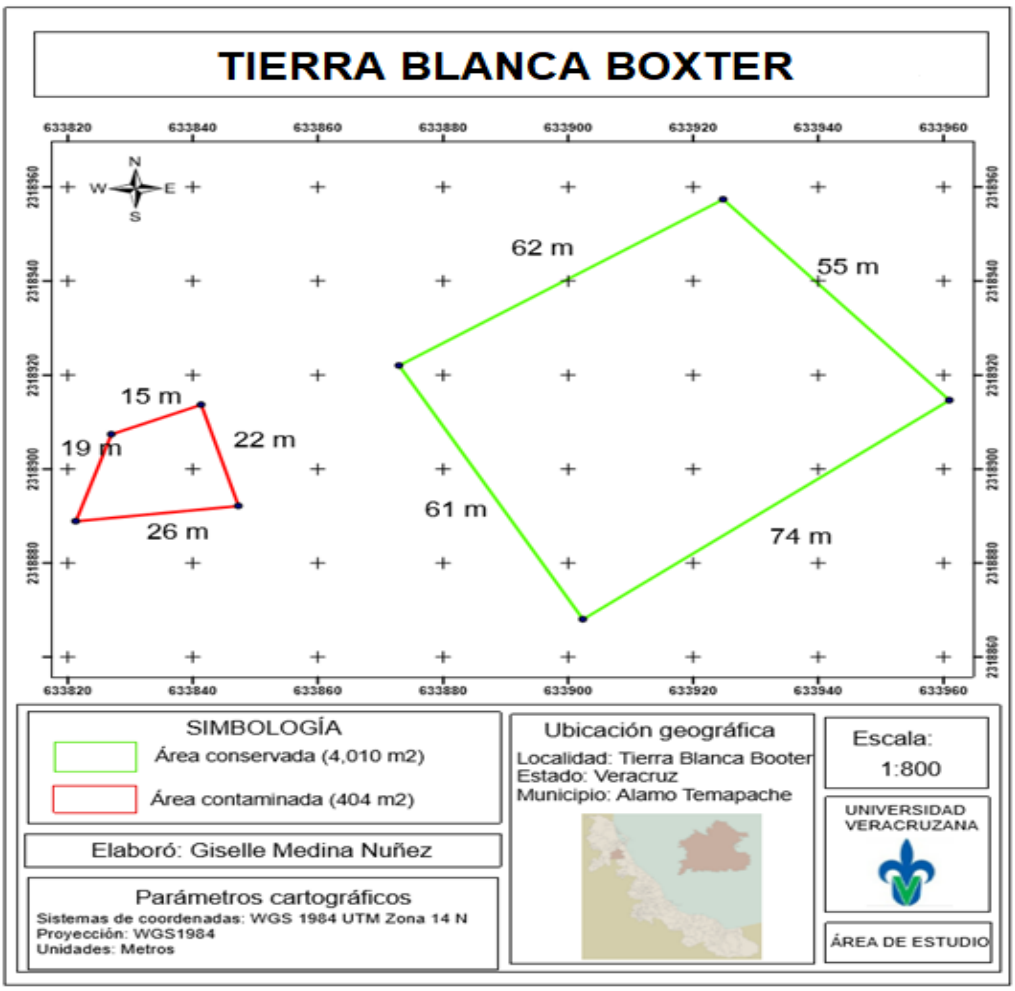


Figura 2. Polígono de un sitio contaminado por derrames de hidrocarburos y de un sitio conservado de la localidad de Tierra Blanca Boxter, Ver.

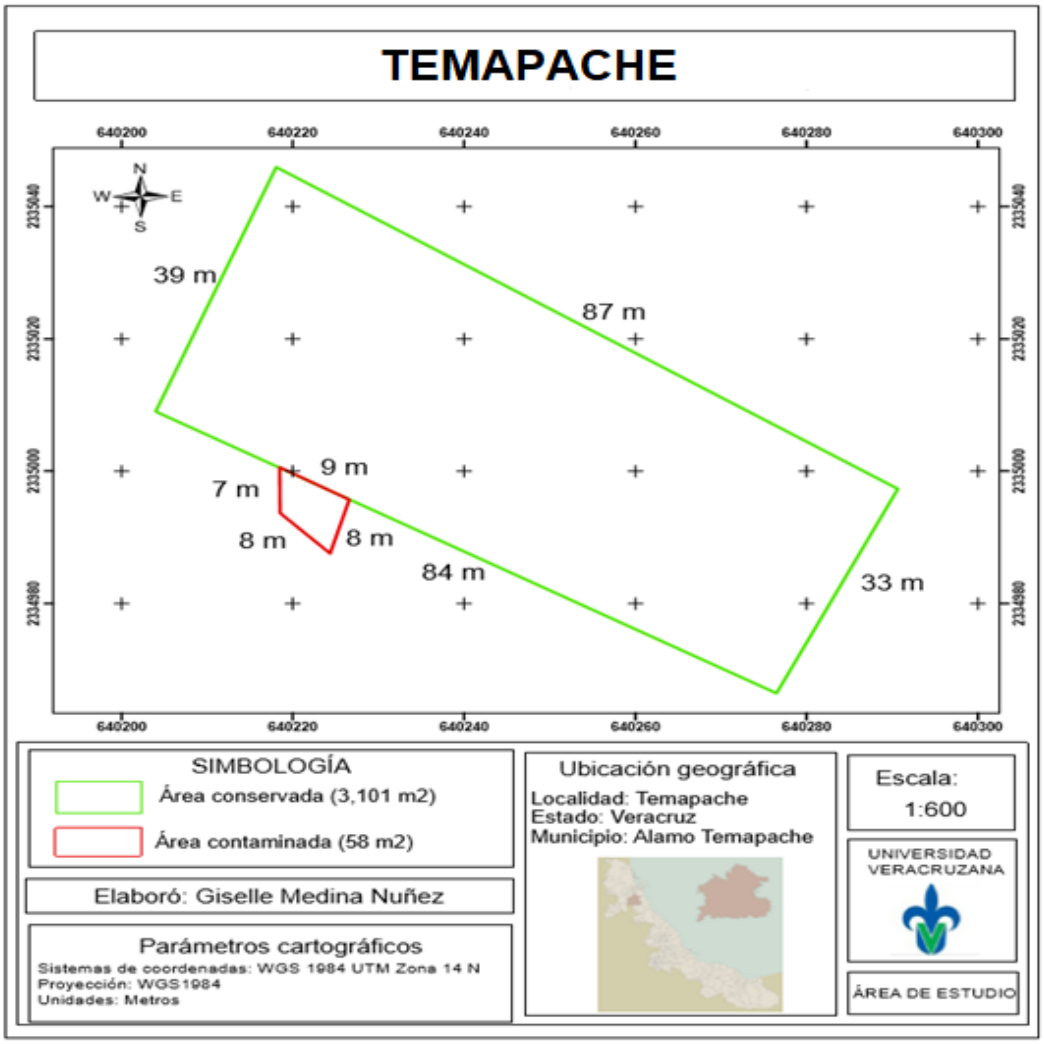


Figura 3. Polígono de un sitio contaminado por derrames de hidrocarburos y de un sitio conservado de la localidad de Temapache, Ver.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Toma de muestras y análisis de suelo

Se seleccionaron cinco puntos de muestreo en los sitios contaminados (T y TBB) y se realizó una muestra compuesta., este muestreo fue dirigido de acuerdo con Volke *et al.,* 2005; NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012. La recolección de muestras se realizó de manera superficial (0-30 cm), tomando como referencia el área contaminada y el área conservada de cada sitio: En cada punto de muestreo se extrajo 500 g de suelo a la profundidad 0-30 cm.

Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de suelos de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Veracruzana en la ciudad de Tuxpan, Veracruz donde fue tamizado con una malla de 2-3 mm para eliminar cualquier tipo de residuo u otro material no deseado.

5.2. Análisis fisicoquímicos del suelo

Una vez procesadas las muestras se realizaron los siguientes análisis fisicoquímicos: clase textural por el hidrómetro de Bouyoucos, densidad aparente por el método de la probeta, humedad, pH, salinidad y temperatura con ayuda del multiparámetro, determinación de fosforo con el equipo Hach y determinación de la materia orgánica por la técnica de Walkley y Black (1934).

5.2.1. Determinación de la concentración HTP en el suelo

Se determinaron los hidrocarburos presentes en el suelo de las dos localidades mediante la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 y el método 3540 C de la EPA (2015).

Para la extracción de los hidrocarburos en los suelos contaminados se utilizó un equipo Soxhlet, tomando como referencia el método de la EPA 3540 C (2015), utilizando 10 g de suelo seco y tamizado colocado en dedales de celulosa. Se utilizaron matraces de bola con capacidad de 250 ml a los cuales se adiciono 150 ml de diclorometano como disolvente y se procedió al ensamblado del equipo Soxhlet, el cual se calentó hasta punto de ebullición y se mantuvo el reflujo en esas condiciones en un periodo de 8 horas.

Posterior a las ocho horas, el diclorometano con hidrocarburos obtenido del equipo Soxhlet fue concentrado mediante un rotavapor a 70 rpm y a una temperatura de 50 º C. A la muestra concentrada del matraz se le agrego nuevamente diclorometano y con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico se extrajeron y colocaron en un filtro, el cual contenía sulfato de sodio con la finalidad de recuperar el 98% de crudo libre de humedad y partículas finas de suelo; esto se llevó a cabo sobre un vial con capacidad de 1.5 mililitros. Una vez recuperado el hidrocarburo se evaporó el disolvente por 24 horas, cuando este se evaporo, los HTP se calcularon con la siguiente formula:

$$\frac{\text{Peso del vial s/crudo- peso del vial c/crudo}}{\text{Cantidad del suelo}} = \text{Concentración HTP}$$

No obstante, también se utilizó el hexano como disolvente para la extracción de los hidrocarburos con la finalidad de realizar una comparación entre las concentraciones obtenidas en este proceso (Anexo 1 y 2).

5.3. Análisis preliminar de la actividad microbiana en las muestras de suelo

Para predecir la viabilidad de una técnica de biorremediación es importante determinar antes la capacidad degradativa de los microrganismos del sitio contaminado por lo que se realizó el siguiente experimento el cual consistió en utilizar 10 g de suelo (fase sólida) y 100 mL de medio mineral (fase líquida) (1:10) dicha solución se mezcló mediante un agitador durante un mes con el fin de estimular la actividad microbiana y calcular la concentración de hidrocarburos. Posteriormente se separaron las dos fases por vacío y se le adiciono diclorometano a cada una para separar el petróleo presente en ellas, este fue extraído a través del equipo Soxhlet para saber el porcentaje de remoción de los HTP. Se determinó el porcentaje de degradación mediante la siguiente formula:

$$Ci - Cf = X$$

$$\frac{(X)\,(100)}{Ci} = \%\ \text{de degradación}$$

Dónde: Ci = Concentración inicial, Cf= concentración final y X= cantidad de hidrocarburo removido.

5.4. Identificación microbiana y selección de microrganismos hidrocarbonoclastas

Una vez que se constató la actividad microbiana, se procedió al siguiente paso que fue el aislamiento microbiano. Se tomó 1 g de suelo y se le adiciono 9 mL de medio mineral (Cuadro 3), estos se agitaron y posteriormente se realizaron

disoluciones seriadas (Figura 4). Con la disolución $1/10^5$ se realizaron siembras en agar nutritivo para las bacterias y medio dextrosa Sabouraud para hongos.

Cuadro 3. Composición química para 1L de medio mineral.

Reactivo	Formula	
Fosfato dibásico de sodio	Na_2HPO_4	2.13 g
Fosfato monobásico de potasio	KH_2PO_4	1.30 g
Cloruro de amonio	NH_4Cl	0.50 g
Sulfato de magnesio	$MgSO_4$	0.20 g

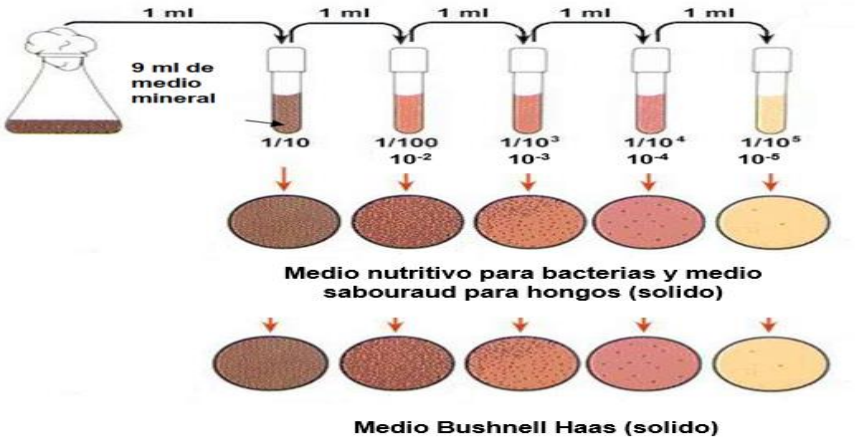


Figura 4. Aislamiento microbiano mediante disoluciones seriadas.

Las cepas bacterianas utilizadas para realizar el proceso de biorremediación fueron seleccionadas de acuerdo con el crecimiento que presentaron en el medio Bushnell Haas, las cuales formaban colonias aisladas y en el caso de las cepas fúngicas se tomó una asada de esporas y se sembró en medio Bushnell Haas, en caso de crecer en este medio, se consideran que los hongos poseen actividad hidrocarbonoclasta.

Una vez realizado el aislamiento de los microrganimos hidrocarbonoclastas por sitio, se realizo su identificacion mediante la tincion gram (bacterias) y tincion azul de algodón (hongos) dichas metologias se encuentran agregadas en el anexo 4.

5.5. Cultivo de microrganismos para la biorremediación del suelo

Las cepas bacterianas y fúngicas se activaron en medio LB (bacterias) y medio de papa natural con dextrosa (hongos) durante 24 horas sometidas a agitación de 225 rpm y a una temperatura de 30 º C hasta alcanzar una D.O de 3.51 la cual representa una concentración de 10^7 células/mL, en un espectrofotómetro Beckman a una longitud de onda de 600 nm (inoculo).

5.6. Degradación de HTP bajo condiciones experimentales

Para el desarrollo de los tratamientos de biorremediación se prepararon tres tratamientos (T) diferentes, que consistieron en lo siguiente: T1-Bioaumentación con bacterias, T2- Bioaumentación con hongos y T3-Biaumentación con bacterias y hongos. Estos tratamientos se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer de 150 mL, cada matraz contenía 20 g de suelo contaminado del sitio a evaluar, 18 mL de medio mineral y 2 mL de inoculo (Cuadro 4) (1:1 P-V), el inoculo bacteriano estaba compuesto de un consorcio formado de seis cepas bacterianas (C6-TBB, C7-TBB, C10-TBB y C1-T,C3-T,C7-T) y para el inoculo fúngico solo se utilizó un hongo del género *Aspergillus* (H3-TBB), los tratamientos se llevaron a cabo a una temperatura de 35 ºC dentro de una incubadora con agitación orbital de 150 RPM, sin luz, simulando un RSA (Figura 5) durante 30 días.

Cuadro 4. Composición de los tratamientos biológicos.

Tratamiento	Suelo	Inóculo	Medio mineral
Bioaumentación con bacterias	20 g	2 mL bacterias	18 mL
Bioaumentación con hongos	20 g	2 mL hongos	18 mL

Bioaumentación con hongos y bacterias	20 g	1 mL de bacterias, 1 mL de hongos	18 mL

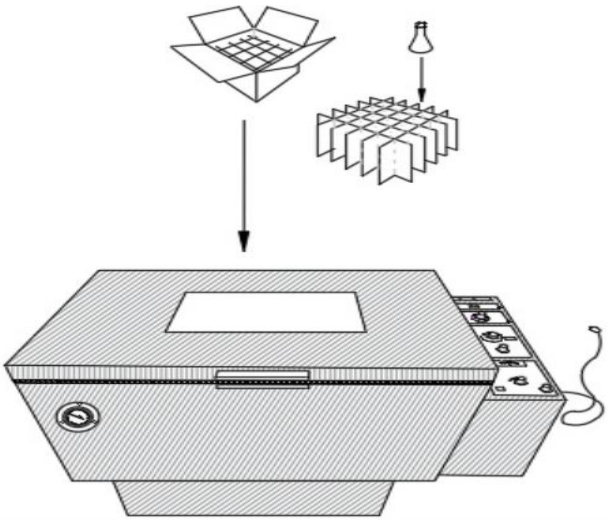


Figura 5. RSA simulado.

Transcurridos los 30 días de incubación, el porcentaje de degradación de HTP fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{Mg}{Kg} = \frac{\text{Tiempo inicial- Tiempo final}}{\text{Tiempo final}} \times 100 = \%\ \text{de degradación}$$

VI. RESULTADOS

6.1. Propiedades físicas de Temapache y Tierra Blanca Boxter, Ver.

De acuerdo con los análisis físicos realizados de manera superficial (0-30 cm) en el área contaminada y en el área conservada se obtuvieron tres tipos de suelo diferentes: franco limoso, franco arcilloso-limoso y arcilla arenoso. La densidad aparente vario de 1.25 g/cm^3 a 1.17 g/cm^3 en Tierra Blanca Boxter y en Temapache esta fue de 1.3 g/cm^3 a 1.4 g/cm^3 catalogándose como normal (Velasco, 1983; Maruri y Rodríguez, 2014). La humedad fue de 12 %-17 % en Tierra Blanca Boxter y Temapache presentó una humedad de 20 %-25 %. La salinidad se consideró como muy baja en ambos sitios, Tierra Blanca Boxter presentó cifras de 0.00568 ppm- 0.0186 ppm y en el Temapache esta fue de 0.0131 ppm- 0.0399 ppm, por los valores anteriores dicho suelo se catalogó como no salino (Velasco, 1983; Maruri y Rodríguez, 2014). La temperatura en Tierra Blanca Boxter fue de 24-28 º C y en Temapache 24-25º C (Cuadro 5).

Cuadro 5. Propiedades físicas de Tierra Blanca Boxter y Temapache, Ver.

Tierra Blanca Boxter		
Propiedad	**0-30 cm**	**Sitio conservado 0-30 cm**
Textura	Franco limoso	Franco arcilloso-limoso
Densidad aparente	1.25 g/cm^3	1.17 g/cm^3
Salinidad	0.0186 ppm	0.00568 ppm
Humedad	17 %	12 %
Temperatura	24 º C	28 º C
Temapache		
Propiedad	**0-30 cm**	**Sitio conservado 0-30 cm**
Textura	Arcilla arenoso	Arcilla arenoso
Densidad aparente	1.3 g/cm3	1.4 g/cm3
Salinidad	0.0399 ppm	0.0131 ppm
Humedad	25 %	20 %
Temperatura	24 º C	25 º C

6.2. Propiedades químicas de Tierra Blanca Boxter y Temapache, Ver.

Los resultados de los análisis químicos del suelo mostraron un pH 7.5-7.6 unidades en Tierra Blanca Boxter y en Temapache 6.7-7 unidades catalogándose este como ligeramente alcalino (Velasco, 1983; Maruri y Rodríguez, 2014). Por otro lado, la materia orgánica registró un valor de 7. 38 %-10.65 % en Tierra Blanca Boxter la cual varió de extremadanamente pobre a extremadamente rica, en Temapache esta presentó valores de 1.30%- 2.79 %. En la determinación de minerales el nitrógeno fue muy bajo, los valores que se registraron de este elemento en Tierra Blanca Boxter fueron 0.30%-0.52 % y para Temapache se registró un valor de 0.065 %-1.13%, mientras que el fósforo presentó valores medios, en Tierra Blanca Boxter las cifras fueron 1.25 mg/L-5.24 mg/L y para Temapache 6.6 mg/L- 5.8 mg/L (Cuadro 6).

Cuadro 6. Propiedades químicas de Tierra Blanca Boxter y Temapache, Ver.

Tierra Blanca Boxter		
Propiedad	**0-30 cm**	**Sitio conservado 0-30 cm**
pH	7.5	7.6
Materia orgánica	7.38 %	10.65 %
Fosforo	1.25 mg/L	5.24 mg/L
Nitrógeno	0.30 %	0.52 %
Temapache		
Propiedad	**0-30 cm**	**Sitio conservado 0-30 cm**
pH	6.7	7
Materia orgánica	2.79 %	1.30 %
Fosforo	6.6 mg/L	5.8 mg/L
Nitrógeno	1.13 %	0.065 %

6.3. Extracción de HTP de Tierra Blanca Boxter y Temapache, Ver.

En Tierra Blanca Boxter, se registró un valor inicial de HTP superior a lo que establece la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, el cual fue de 17,701 mg/kg en el área contaminada y en área conservada 2,281 mg/kg. En Temapache el valor también supero lo establecido, siendo de 46,424 mg/kg y en área conservada 9,138 mg/kg.

6.4. Análisis preliminar de la actividad microbiana en las muestras de suelo

En Tierra Blanca Boxter se presentó una concentración inicial de 17, 701 mg/kg y transcurrido el mes de atenuación natural los HTP disminuyeron a 15,153 mg/kg lo que corresponde a 14% de remoción. Mientras que, para Temapache, la concentración inicial fue de 46, 424 mg/kg y transcurrido un mes de atenuación natural los HTP disminuyeron a 16,821 mg/kg lo que corresponde a 63% de remoción.

6.5. Identificación y selección microbiana: bacterias y hongos

Fueron identificadas 19 cepas bacterianas en ambos sitios con morfología variada (bacilos, cocos y barras alargadas), 13 de estas resultaron ser Gram negativas y seis Gram positivas. Es importante resaltar que, de las 19 cepas aisladas, únicamente 10 fueron catalogadas como hidrocarbonoclastas de estas se utilizaron seis cepas para conformar el consorcio microbiano (C6-TBB, C7-TBB, C10-TBB y C1-T, C3-T, C7-T) para el proceso de biorremediación debido a que estas se caracterizaron por formar cultivos axénicos.

De los hongos aislados, crecieron cinco hongos diferentes, los cuales pertenecen a tres géneros: *Rhizopus* (1), *Aspergillus* (2), *Cunninghamella* (1) y

uno de estos se encuentra el proceso de identificación en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) ubicado en la Universidad Autónoma del Estado Morelos (UAEM) en la ciudad de Cuernavaca, Morelos (Anexo 3), los hongos anteriores presentaron actividad hidrocarbonoclasta, no obstante, se utilizó el hongo (H3-TBB) debido a que este corresponde al género *aspergillus* y de acuerdo con Medina *et al.,* (2014); Araujo et al., (2016); Vázquez Martínez *et al.,* (2017), se han obtenido resultados significativos de degradación.

6.6. Valoración de la eficiencia de los tratamientos biológicos de descontaminación de Tierra Blanca Boxter y Temapache, Ver.

En la figura seis y siete se describe el porcentaje de degradación de los consorcios microbianos utilizados en el proceso de biorremediación de Tierra Blanca Boxter y Temapache, Veracruz el cual se conformó de tres tratamientos: T1 Bioaumentación con bacterias, T2 Bioaumentación con hongos y T3 Bioaumentación con bacterias-hongos y en la figura ocho se describen las concentraciones de HTP del día cero a los 30 días del experimento, demostrando que el T3 fue el más efectivo con una remoción de 25.31% (TBB) y 68.43 % (T).

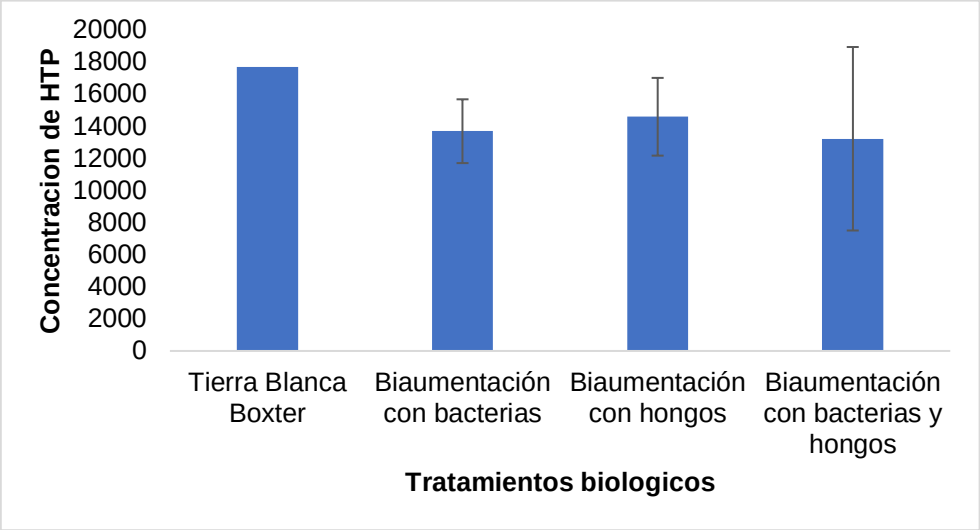


Figura 6. Concentración inicial y final HTP por RSA de Tierra Blanca Boxter.

Cuadro 7. Concentración inicial y final (Promedio ± desviación estándar) de los resultados obtenidos de degradación en Tierra Blanca Boxter.

Tratamientos biológicos	
Concentración inicial	17,701 mg/kg
Bioaumentación con bacterias	13689.33 ± 1986.61 mg/kg
Bioaumentación con hongos	14589.00 ± 2421.38 mg/kg
Bioaumentación con bacterias y hongos	13220.00± 5715.00 mg/kg

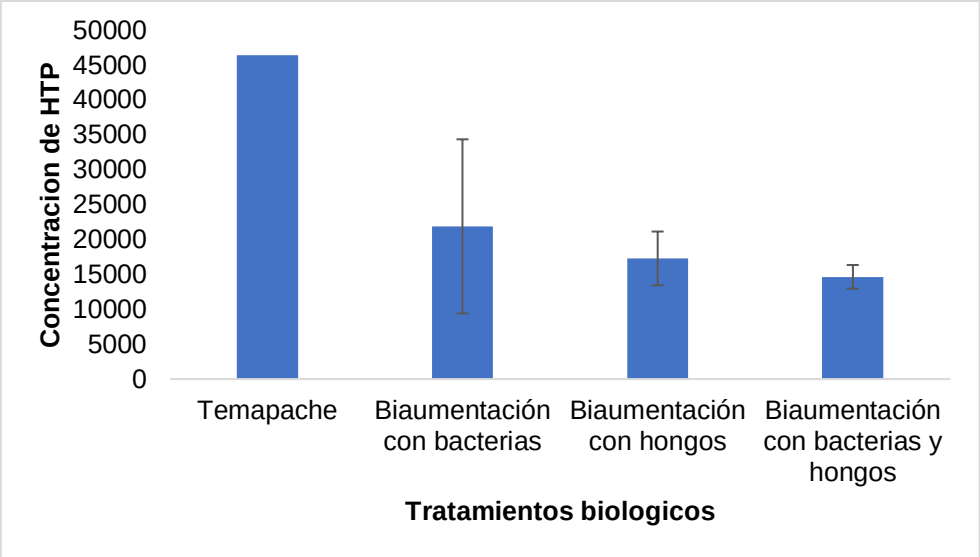


Figura 7. Concentración inicial y final HTP por RSA de Temapache.

Cuadro 8. Concentración inicial y final (Promedio ± desviación estándar) de los resultados de degradación obtenidos en Temapache.

Tratamientos biológicos	
Concentración inicial	46,424 mg/kg
Bioaumentación con bacterias	21890.33 ± 12483.22 mg/kg
Bioaumentación con hongos	17298.00 ± 3855.61 mg/kg
Bioaumentación con bacterias y hongos	14654.33 ± 1701.30 mg/kg

VII. DISCUSIÓN

El estado de Veracruz además de ser uno de los estados de la república mexicana donde más se extrae petróleo, también se destaca por sufrir problemas de contaminación debido a las actividades de la industria petroquímica.

En este estudio, se encontró que la concentración de los HTP en dos localidades del municipio de Álamo, Temapache sobrepasa los límites permisibles establecidos por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2013. En Tierra Blanca Boxter, se presentó una concentración de 17, 701 mg/kg y en Temapache fue de 46, 425 mg/kg, quedó demostrado que ambos sitios están contaminados y sobrepasan lo establecido por la norma antes mencionada. Por otra parte, los sitios conservados presentaron una concentración de 2,281 mg/kg (TBB) y 9,138 mg/kg (T), las registradas anteriormente nos permitieron deducir que el área considerada como conservada también se encuentra afectada por los derrames que se han presentado en los pozos de estos sitios. Se ha detectado acumulaciones de gases tóxicos en grandes concentraciones en zonas contaminadas por hidrocarburos, los cuales impactan de manera negativa en el ambiente afectando humanos, plantas, animales e incluso microorganismos (Caparo, 1912; Granados *et al.,* 2010).

Los suelos contaminados por petróleo son considerados como un microhábitat adecuado para el crecimiento de bacterias degradadoras (Alexander, 1994; Martin *et al.,* 2004; Gómez *et al*., 2008; García-Cruz y Aguirre-Macedo, 2015). La microbiota nativa (TBB y T) encontrada se compuso de 19 cepas bacterianas y 5 cepas fúngicas. Cabe de mencionar que, de las 19 cepas bacterianas, 10 de ellas se catalogaron como hidrocarbonoclastas. En otros estudios como Machin-

Ramirez *et al*., 2007 se identificaron bacterias hidrocarbonoclastas, Aburto-Medina *et al*., (2012) (2) cepas, Haddad *et al*., (2015) (1) cepa, Abou-Shanab *et al*., (2016) (3) cepas, Koshlaf *et al*., (2016) (2) cepas, Patowary *et al*., (2016) (1) cepa y Zhu *et al*., (2016) (2) cepas.

Los hongos identificados en este estudio pertenecen a los géneros *Aspergillus, Rhizopus* y *Cunninghamella*. Investigaciones como la de Medina *et al*. (2014); Araujo *et al*. (2016) y Vázquez Martínez *et al*. (2017), identificaron hongos del mismo género, los cuales, según Herrera y Ulloa (2013) han sido utilizados con éxito en procesos de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por petróleo.

A pesar de que en los suelos contaminados por hidrocarburos hay una amplia diversidad de microrganismos y la mayoría de estos tienen actividad hidrocarbonoclasta, esta actividad se puede ver afectada por factores ambientales de gran importancia como la temperatura, pH, materia orgánica y nitrógeno, inhibiendo su crecimiento, lo cual fue constatado en este estudio.

La temperatura mesofílica adecuada de los microorganismos según Bamforth y Singleton (2005) tiene un rango de 15-45 º C, este factor varió en el sitio donde se recolectaron las muestras (TBB y T) 28-35 ºC y en el sitio donde se realizó el proceso de biorremediación (Cuernavaca, Morelos) 12-26 ºC, dicha variación pudo afectar el desarrollo de la microbiota nativa (TBB y T); no obstante se mantuvo dentro del rango y cuando esta se encuentra dentro de lo establecido la degradación se ve favorecida debido a que los microorganismos se desarrollan adecuadamente (Bamforth y Singleton, 2005; Brutti *et al*., 2018).

El pH es un factor importante en la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos debido a que las poblaciones microbianas se pueden ver

afectadas, el nivel óptimo para el desarrollo de la actividad microbiana es de 6-8 unidades (Volke y Velasco, 2002; Bamforth y Singleton, 2005; Gómez *et al*., 2008; Brutti *et al*., 2018). En Tierra Blanca Boxter se obtuvo un valor de 7.3-7.6 unidades y en Temapache 6.7-7 unidades, encontrándose estos resultados dentro de las unidades establecidas.

En suelos ricos de materia orgánica predominan poblaciones bacterianas y fúngicas de acuerdo con Volke y Velasco (2002); Julca-Otiniano *et al*., (2006). Lo antedicho coincide con los resultados obtenidos, en Tierra Blanca Boxter se obtuvo cifras más altas de materia orgánica y una mayor tasa de microorganismos. La cantidad de materia orgánica presentó valores de 0.08-10.65 % en Tierra Blanca Boxter y 1.30-2.79 % en Temapache, catalogando los suelos analizados como extremadamente pobres a ricos (Velasco, 1983; Maruri y Rodríguez, 2014).

Se ha encontrado que, los suelos ricos en nitrógeno tienen marcada la actividad metabólica y la capacidad de desarrollar biomasa (Acuña *et al.,* 2007). En este estudio, la concentración de nitrógeno fue alta en ambos sitios (TBB y T), los valores de este elemento variaron de 0.30-0.62 % (TBB) y 0.13-0.075 % (T), dichos resultados permitieron que los microorganismos nativos utilizados durante el proceso de biorremediación metabolizaran con más facilidad los hidrocarburos.

De acuerdo con lo anterior y con los resultados obtenidos de degradación y los resultados de temperatura, pH, materia orgánica y nitrógeno, estos factores favorecieron los tratamientos biológicos aplicados (T1, T2, T3), alcanzando valores superiores de degradación a los obtenidos por otros autores como Machin-Ramirez *et al*. (2007) y Aburto-Medina *et al.* (2012). En Tierra Blanca

Boxter se obtuvo un valor de 13,689 mg/kg con bacterias, 14,589 mg/kg con hongos y 13, 220 mg/kg con bacterias y hongos, siendo el tercer tratamiento el más efectivo al remover un 25.31 % de HTP. En Temapache se obtuvo un promedio de reducción de 21,890 mg/kg con bacterias, 17,298 mg/ kg con hongos y 14,654 mg/kg con bacterias y hongos, siendo el tercer tratamiento el más efectivo al remover un 68.43 % de HTP. Resultados similares de reducción de HTP con RSA se pueden observar en el estudio de Machín-Ramírez *et al*., (2007), en donde se alcanza un 24 % de reducción en 15 días. En otras investigaciones con RSA como Aburto-Medina *et al.,* (2012), se alcanzó un 41.3-51.6 % de reducción en 42 días. Con relación a lo antes citado y al porcentaje obtenido en esta investigación el cual fue superior, queda demostrado que la técnica empleada en el presente trabajo resulta efectiva a corto plazo.

Los resultados obtenidos en este proyecto servirán como consulta y referente bibliográfico para futuras investigaciones ya que de los sitios estudiados no se encontraron reportes. Es importante mencionar que es de gran importancia para futuras investigaciones realizar el análisis de degradación por parte de los microorganismos de forma individual para poder conocer su comportamiento de estos y determinar su capacidad degradativa con el objetivo de alcanzar porcentajes más altos de degradación mediante la técnica de RSA.

VIII. CONCLUSIONES, APLICACIÓN PRÁCTICA DEL TRABAJO Y RECOMENDACIONES

8.1. Conclusiones

Las propiedades físicas y químicas en los suelos estudiados (TBB y T) varían de acuerdo con la topografía de cada sitio.

Con respecto a la microbiota nativa (TBB y T), se identificaron 19 cepas bacterianas y 5 cepas fúngicas.

De las 19 cepas bacterianas, 10 de ellas se catalogaron como hidrocarbonoclastas.

Las concentraciones de HTP registradas en ambos sitios conservados, sobrepasaron los límites permisibles establecidos por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012.

De los tres tratamientos empleados se comprobó que para ambos sitios (TBB y T) tuvo mayor eficiencia la bioaumentación con bacterias y hongos ya que con este tratamiento se alcanzó 25.31-68.43 % de degradación en 30 días.

8.2. Aplicación práctica del trabajo

Este proyecto se realizó con la finalidad de contrarrestar el daño ambiental ocasionado por derrames de hidrocarburos en las localidades de Tierra Blanca Boxter y Temapache, Veracruz el cual se deriva de las fugas generadas en los pozos petroleros que se encuentran en estos sitios. De acuerdo con los resultados que se obtuvieron se considera que la técnica aplicada “Reactores de suelos activados” podría ser utilizada a mayor escala para reducir la presencia de hidrocarburos en estas dos localidades y zonas aledañas. Además de que la

técnica RSA tiene importantes ventajas como: Esta estrategia puede ser utilizada a pequeña y gran escala, es efectiva a corto plazo, la actividad microbiana es estimulada a través de la agitación lo que favorece la degradación.

8.3. Recomendaciones

Para que el proceso de biorremediación logre ser efectivo es necesario considerar las siguientes dos fases:

Fase de laboratorio:

- Muestreo: Delimitación del área de estudio, recolección de muestras de suelo y análisis de propiedades físicas y químicas.
- Extracción de HTP: Método 3540 C EPA (2015) y NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012.
- Aislamiento, identificación y selección de microrganismos nativos con capacidad hidrocarbonoclasta: Bacterias y hongos.
- Análisis preliminar de la actividad microbiana en las muestras de suelo.

Fase de campo:

Para desarrollar dicho proceso es necesario cumplir con todas las variables antes mencionadas (nitrógeno, fosforo, materia orgánica, pH, salinidad, temperatura, humedad, textura, densidad aparente y HTP), una vez que se demuestre que se están degradando los hidrocarburos por medio de los microorganismos nativos podría llevarse a esta escala, sin embargo, es de gran importancia evaluar previamente la capacidad degradativa de las cepas de manera individual ya que estas fueron utilizadas como consorcio, incluso podrían modificarse los tratamientos en cuanto al número de repeticiones y composición,

adecuándolos a las necesidades de cada sitio donde se consideraría la dimensión del área afectada, volumen de suelo, tiempo del impacto generado, cantidad de derrames y fechas en las que han ocurrido. Además, de que dicha propuesta debe de ser planteada y aprobada por la empresa privada que ha generado el impacto.

También es importante considerar los siguientes puntos, los cuales servirán para reforzar el proyecto propuesto en caso de llevarlo a cabo.

- Realizar el perfil y el fraccionamiento de los hidrocarburos para saber su composición y que fracciones se están degradando.
- Evaluar la capacidad degradativa de las cepas seleccionadas en el proceso de biorremediación de manera individual.
- Determinar la fuente de carbono CO_2 de los microorganismos nativos.

IX. BIBLIOGRAFIA

Abou-Shanab, R.A., Eraky, M., Haddad, A.M., Abdel-Gaffar, A.R.B., y Salem, A.M. 2016. Characterization of Crude Oil Degrading Bacteria Isolated from Contaminated Soils Surrounding Gas Stations. Springer. **97:** 684-688.

Aburto-Medina, A., Adetutu, E.M., Aleer, S., Weber, J., Patil, S.S., Sheppard, P.J., Ball, A.S., y Juhasz, A.L. 2012. Comparison of indigenous and exogenous microbial populations during slurry phase biodegradation of long-term hydrocarbon-contaminated soil. Springer. **23:** 813–822.

Acuña, A.J., Pucci, O.H., y Pucci, G.N. 2007. Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de Patagonia Argentina. Revista ecosistemas. **17 (2)**: 85-93.

Alexander, M. 1994. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, San Diego, California. 443 pp.

Araujo, J., Yegres, F., Barreto, G., Antequera, A., Depool, B., y Yarubit, R. 2016. Biocatalizadores fúngicos hidrocarbonoclásticos del género Aspergillus para la descontaminación de agua con Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPAs). Rev. Cubana Quím. **28 (2):** 703-735.

Bamforth, S.M., y Singleton, I. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. Fournal of Chemical Technology and Biotechnology. **80:** 723-736.

Brutti, L., Beltrán, M., y García, I. 2018. Biorremediación de los recursos naturales. Ediciones INTA. Instituto de Suelos, Centro de Investigación de Recursos Naturales. Hurlingham, Buenos Aires. 492.

Caparo, J. 1912. Ácido Sulfúrico. Guía. 18.

Chan-Quijano, J.G., Jarquín-Sánchez, A., Ochoa-Gaona, S., Martínez-Zurimendi, P., López-Jiménez, L. N., y Lázaro-Vázquez, A. 2015. Directrices para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos Teoría y Praxis. **(17):** 123-144.

EPA. 2015. Method 3540C. Soxhlet extraction. United States Environmental Protection Agency, SW-846 Manual. Washington, DC: Government Printing Office. 1-8.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2015. [Actualizado el 22 de octubre del 2017] Página electrónica: (http://www.fao.org/home/es/)

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2017. [Actualizado el 22 de octubre del 2017] Página electrónica: (http://www.fao.org/home/es/)

Gómez, S.E., Gutiérrez, D.C., Hernández, A.M., Hernández, A.M., Losada, M., y Mantilla, P.C. 2008. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por Pseudomonas en suelos contaminados por hidrocarburos. Nova-Publicación científica en ciencias biomédicas. **6 (9):** 101-212.

García-Cruz, N.U., y Aguirre- Macedo, M.L. 2015. Biodegradación de petróleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México. Golfo De México. Contaminación e impacto ambiental: Diagnostico y tendencias. 641-652.

Granados, D., López, J.F., y Hernández, M.A. 2010. Lluvia ácida y los ecosistemas forestales. Scielo. **16(2):** 20.

Haddad, M.S., Ebrahimipour, G., Moghadam, M.S., Fakhari, J y Abdoli, T. 2015 Bioremediation of Crude Oil Using Bacterium from the Coastal Sediments of Kish Island, Iran. Iran J Public Health. **45(5):** 670-679.

Herrera, T., y Ulloa, M. 2013. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. Ciencia y tecnología. Universidad Nacional Autónoma De México, Fondo De Cultura Económica. México, Df.

INE. Instituto nacional de ecología. 2007. [Actualizado el 20 de octubre del 2017] Página electrónica: (http://www2.inecc.gob.mx/)

INECC. Instituto nacional de ecología y cambio climático. 2007. [Actualizado el 20 de octubre del 2017] Página electrónica: (http://www2.inecc.gob.mx)

INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2010. [Actualizado el 23 de octubre del 2017] Página electrónica: (http://www.inegi.org.mx)

Julca-Otiniano, A., Meneses-Florián, L., Blas-Sevillano, R., y Bello-Amez, S. 2006. La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. 24 (1): 49-61 pp.

Koshalf, E., Shahsavari, E., Aburto-Medina, A., Taha, M., Haleyur, N., Makadia, T.H., Morrison, P. D., y Ball, A.S. 2016. Bioremediation potential of diesel-contaminated Libyan soil. Elsevier.**133:** 297-305.

Machin-Ramirez, C., Okoh, A.I., Morales, D., Mayolo-Deloisa, K., Quintero, R., y Trejo Hernández, M.R. 2007. Slurry-phase biodegradation of weathered oily sludge waste. Chemosphere. **70:** 737-744.

Martínez-Prado, A., Pérez-López, M.E., Pinto-Espinoza, J., Gurrola-Nevárez, B.A., y Osorio-Rodríguez, A.L. 2011. Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. Rev. Int. Contam. Ambient. **27 (3):** 241-252.

Martin, C., González, A., y M.J, Blanco. 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. Rev. Iberoam Micol. **21:** 103-120.

Maruri, J.M., y Rodríguez, R. 2014. Uso actual y potencial del suelo. Manual.

Medina, J., García, F., y Paricaguan, B. 2014. Biodegradación de petróleo por microorganismos autóctonos en suelos contaminados provenientes de la bahía de Amuay del Estado Falcon. Rev. Ingeniería UC. **21 (1):** 62-69.

Mendoza, A., Cram, S., Sommer, I., Oropeza, O. 2010. Atlas regional de impactos derivados de las actividades petroleras en Coatzacoalcos, Veracruz. Primera Edición, México, D.F.

NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación.

Ortínez, B., I. Oscar I., y Gavilán, I. 2003. La restauración de suelos contaminados por hidrocarburos en México. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Gaceta ecológica. México, D.F. **69:** 83-92.

Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M.C. y Deka, S. 2016. Development of an Efficient Bacterial Consortium for the Potential Remediation of Hydrocarbons from Contaminated Sites. Research. **7 (1092):** 1-14.

Petit A., Colina L., Yegres E., Moran G., y Richart-Yegres. 2013. Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) por hongos aislados de aguas contaminadas con petróleo, podredumbre blanca, y acíbar de Aloe vera. Rev. Química viva. **3:** 1-17.

Raiger, L.J., y López, N.I. 2009. Los biosurfactantes y la industria petrolera. Rev. Química Viva. **8 (3):** 146-161.

Silva, S.M., y Correa, F. J. 2009. Análisis de la contaminación del suelo: Revisión normativa y posibilidades de la regulación económica. Rev. Semestre económico. **12 (23):** 13-34.

Serrano, M.F., Torrado, L.M y Pérez, D.D. 2013. Impacto de los derrames de crudo en las propiedades mecánicas de suelos arenosos, Colombia. Sección ciencia y tecnología. **11 (12):** 233-244.

SEMARNAT. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2013. [Actualizado el 20 de octubre del 2017] Página electrónica: (www.semarnat.gob.mx)

Torres, D. 2003. El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. Rev. Ecosistemas. Redalyc. **12 (2):** 1-5. Asociación Española de Ecología Terrestre Alicante, España.

US EPA 3540C. 2015. Soxhlet extraction organics. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical method.

Vázquez Martínez, A., Rodríguez Casasola, M.T., Cruz Mondragón, C., Ríos Leal, E., y Esparza García, F.J. 2017. Caracterización de hongos

hidrocarbonoclastas aislados de un suelo contaminado. Rev. Mexicana de Agroecosistemas. **4 (1):** 58-64.

Velasco, M., H. A. 1983. Uso y manejo del suelo: Estudio de campo, determinaciones fìsicas y quimicas, practicas de recuperacion y manejo, Limusa. Mexico. 191.

Volke, T., y Velasco, J.A. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. INE-SEMARNAT. México, Df. 64.

Volke, T., Velasco, J.A., y Rosa, D.A. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. INE-SEMARNAT. México, Df. 144.

Wang, T., Wang, J., y Jin, Y. 2007. Slurry Reactors for Gas-to-Liquid Processes: A Review. Ind. Eng. Chem. Res, China. **46:** 5824-5847.

Zhu, X., Ni, X., Waigi, M.G., Liu, J., Sun, K., y Gao, Y. 2016. Biodegradation of Mixed PAHs by PAH-Degrading Endophytic Bacteria. Int. J. Environ. Res. Public Health .**13 (8):** 805.

X. ANEXOS

Anexo 1. Método 3540 C establecido por la EPA utilizando hexano como disolvente

Se utilizó 5 g de suelo seco y finamente molido en papel filtro y se introdujo en dedales de celulosa, posteriormente se colocaron dentro de la columna extractora del equipo Soxhlet.

Se utilizaron matraces de bola con capacidad de 500 mL los cuales fueron pesados en una balanza analítica y se tomaron los datos de peso. A continuación, se adiciono 90 mL de hexano como disolvente y se procedió al ensamblado del equipo Soxhlet, se inició el calentamiento hasta alcanzar el punto de ebullición y se mantuvo el reflujo en esas condiciones durante un periodo de 8 horas de tal manera que se efectúo entre 6 y 8 reflujos por hora, esto con la finalidad de permitir la liberación de los analitos.

Posterior a 8 horas el Hexano fue recuperado y los matraces conteniendo los hidrocarburos, se colocaron en un desecador para la evaporación total del solvente durante doce horas, previamente el peso de los matraces se volvió a registrar.

La concentración total del HTP, se calculó de la siguiente manera:

HTPs (mg kg -1 de s.s.) = (RB-RA) * (FC) / (P* FH)

Dónde:

HTP’s (mg kg de s.s) = hidrocarburos totales de petróleo en mg/kg de suelo seco.

RA= peso (mg) del recipiente vacío a peso constante.

RB= peso (mg) del recipiente con el extracto orgánico concentrado.

P= cantidad del suelo extraído (g).

FH= factor de corrección de humedad (1-(% humedad/100)).

FC= factor de corrección para transformar a kg de s.s. = 1000.

El resultado se expresará en mg de HTP/kg de suelo seco.

Anexo 2. Resultados obtenidos durante la extracción de HTP con Hexano

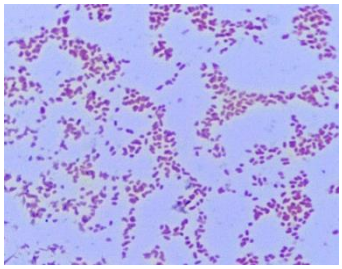
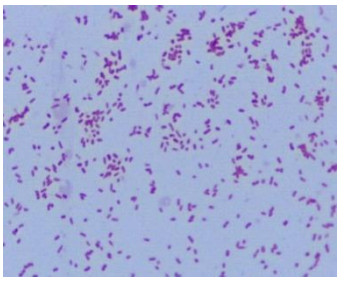
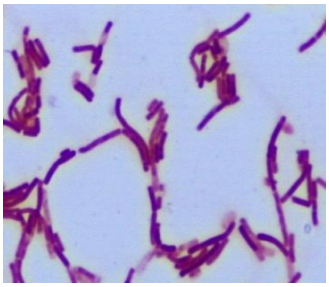
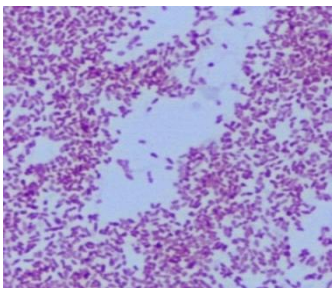
Mediante este disolvente la concentración de HTP en ambos sitios presento valores diferentes (Cuadro 9).

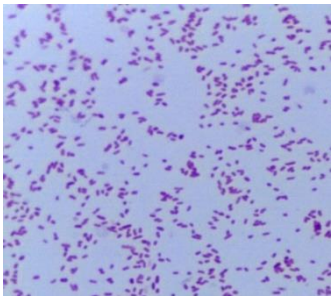
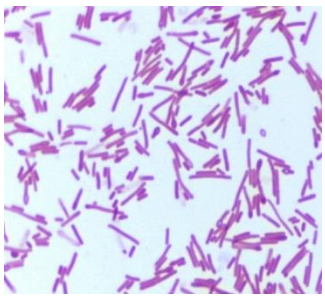
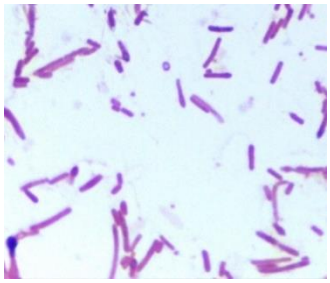
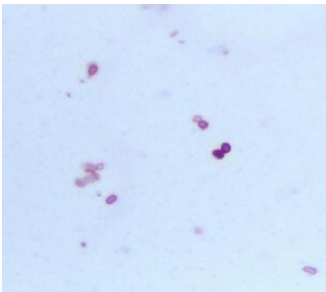
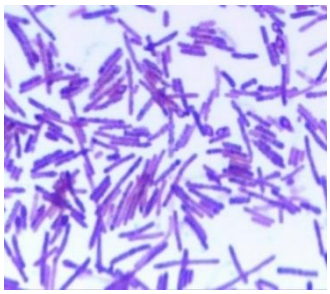
Cuadro 9. Resultados de HTP con Hexano

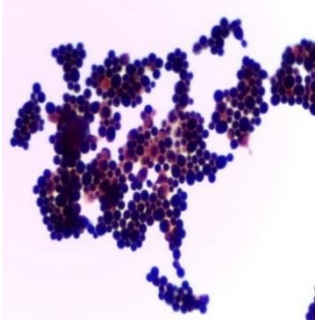
Tierra Blanca Boxter sitio contaminado	**Temapache sitio contaminado**
14, 341.2 mg/kg	19, 185 mg/kg
Tierra Blanca Boxter sitio conservado	**Temapache sitio conservado**
292. 65 mg/ kg	3, 758.2 mg/kg

Anexo 3. Aislamiento microbiano de Tierra Blanca Boxter y Temapache, Ver

Cuadro 10. Bacterias aisladas de Tierra Blanca Boxter

Cepa	40 x	Morfología	Gram
C1-TBB		Bacilos cortos	Negativo (-)
C2-TBB		Bacilos cortos	Negativo (-)
C3-TBB		Diplobacilos	Positivo (+)
C4-TBB		Bacilos cortos	Negativo (-)

C5-TBB		Bacilos cortos	Negativo (-)
C6-TBB		Bacilos largos	Negativo (-)
C7-TBB		Bacilos medios	Negativo (-)
C8-TBB		Cocobacilos	Negativo (-)
C9-TBB		Bacilos largos	Positivo (+)

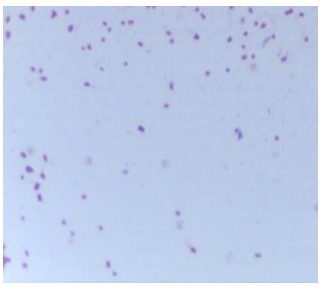
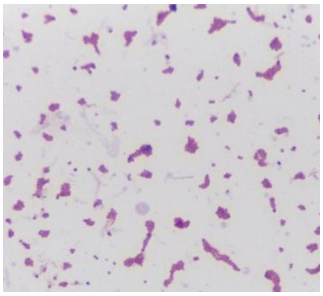
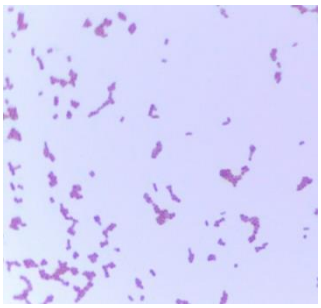
C10-TBB		Estafilococos	Positivo (+)

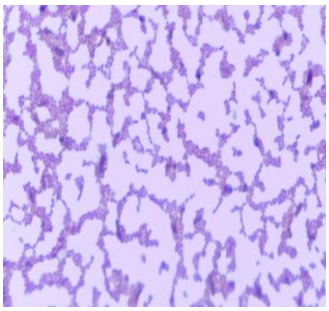
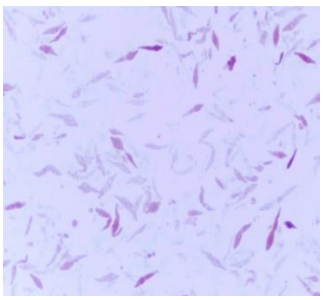
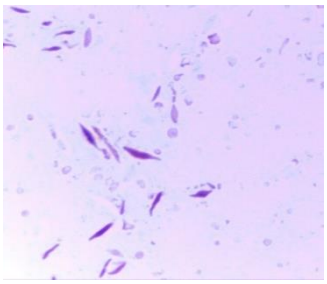
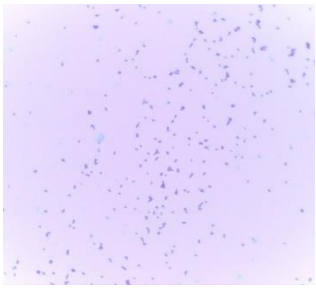
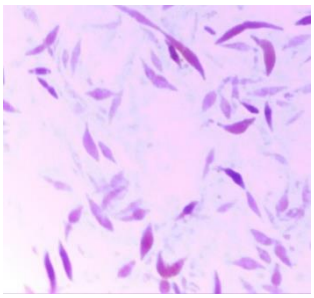
Cuadro 11. Hongos aislados en Tierra Blanca Boxter

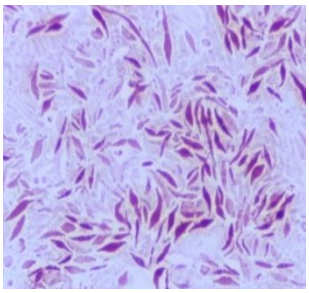
Género	**Crecimiento día dos**	**Crecimiento día cuatro**
Rhizopus (H1-TBB)		
*Aspergillus (*H2-TBB) (H3-TBB)		

Cunninghamella (H3-TBB)		

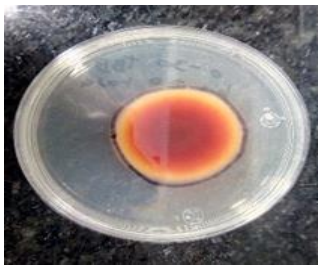
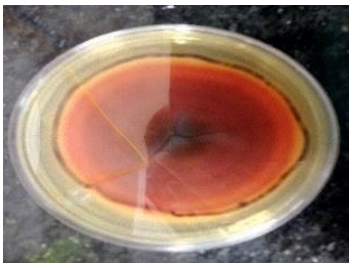
Cuadro 12. Bacterias aisladas en Temapache

Cepa	40 X	Morfología	Gram
C1-T		Cocos	Negativo (-)
C2-T		Estafilococos	Negativo (-)
C3-T		Estafilococos	Negativo (-)

C4-T		Bacilos cortos	Positivo (+)
C5-T		Barra alargada	Negativo (-)
C6-T		Barra alargada	Positivo (+)
C7-T		Diplococos	Positivo (+)
C8-T		Barras alargadas	Negativo (-)

C9-T		Barras alargadas	Negativo (-)

Cuadro 13. Hongos aislados en Temapache

Género	Crecimiento día dos	Crecimiento día cuatro
		

Anexo 4. Tinción Gram y azul de algodón

Tinción Gram

Con la ayuda de un asa bacteriológica se tomaron las colonias puras de cada caja Petri, las cuales fueron puestas sobre portaobjetos donde se le adiciono una gota de agua destilada y con otro portaobjeto fueron arrastradas, por la parte inferior se pusieron dos segundos en el mechero para su fijación, posteriormente de que fueron fijadas las bacterias, se realizó la tinción Gram la cual consiste en teñir las bacterias con cristal violeta (1 minuto), lugol (1 minuto), alcohol acetona (1 minuto), y safranina (30 segundos).

Azul algodón

La tinción de azul de algodón fue empleada para observar los hongos que fueron aislados, esta consistió en utilizar un portaobjetos y agregarle una gota de azul de lactofenol y tomar mediante una aguja de disección una fracción del micelio y fijarlos en la misma gota, posteriormente se agregó sobre la gota un cubreobjetos y se observaron en el microscopio.